

肝内转移与多中心发生多结节肝癌的比较蛋白质组学分析

苏 铭¹, 黎乐群², 彭 涛¹, 郭 雅¹, 肖开银¹,
尚丽明¹, 徐邦浩¹, 李仕来¹, 苏智雄¹, 叶新平¹

Comparative proteomic analysis of differentiating multicentric occurrence and intrahepatic metastasis in multinodular hepatocellular carcinoma

Ming Su,¹ Le-Qun Li,² Tao Peng,¹ Ya Guo,¹ Kai-Yin Xiao,¹ Li-Ming Shang,¹
Bang-Hao Xu¹, Shi-Lai Li,¹ Zhi-Xiong Su¹ and Xin-Ping Ye¹

1. 广西医科大学第一附属医院
肝胆外科,
广西南宁 530021
2. 广西医科大学附属肿瘤医院
肝胆外科,
广西南宁 530021

1. Department of Hepatobiliary Surgery,
The First Affiliated Hospital of
Guangxi Medical University,
Nanning, 530021, Guangxi Zhuang
Autonomous Region, P.R.China
2. Department of Hepatobiliary Surgery,
Tumor Hospital of
Guangxi Medical University,
Nanning, 530021, Guangxi Zhuang
Autonomous Region, P.R.China

通讯作者:黎乐群

Correspondence to: Le-Qun Li

Email: Li_lequn@263.com

基金项目: 国家自然科学基金项目
(No. 30460143, 30560133); 广西自然
科学基金(桂科自 0640101); 广西地
方性高发疾病重点实验室科学基金
(桂科能 0630006-5E1K); 广西大型仪
器协作共用网基金(No. 468-2007-
047); 广西科学研究与技术开发计划
项目基金(桂科攻 0632007-1E)

Grants: National Natural Science
Foundation of China (No. 30460143,
No. 30560133), Guangxi Natural
Science Foundation (No. 0640101),
Science Foundation of High-Incidence
Endemic Diseases in Guangxi Key
Laboratory (No. 0630006-5E1K),
Guangxi's Large-scale Collaboration to
Share Network Equipment (No. 468-
2007-047), Guangxi Scientific Research
and Technological Development Project
(No. 0632007-1E)

收稿日期:2009-06-30

接受日期:2009-09-23

[Abstract] Background and Objective: Multinodular hepatocellular carcinoma (HCC) might originate from multicentric occurrence (MO) or intrahepatic metastasis (IM). This study was to find out proteins which play important roles in clonal origin of multinodular hepatocellular carcinoma by screening the differentially expressed proteins between the MO and IM tissues using comparative proteomic analysis. **Methods:** Total protein extracted from the MO and IM tissues was separated by two-dimensional gel electrophoresis (2-DE). 2-DE protein patterns between the MO and IM tissues were compared using computerized image analysis. Proteins exhibiting significant alternations were subsequently isolated and identified by mass spectrometry. **Results:** A total of (1025±52) and (900±98) spots could be detected in the protein profile in IM and MO tissues, respectively. The expression levels of 25 protein spots were statistically different between the two groups. Twenty of 25 protein spots were identified by MALDI-TOF-MS and bioinformatics. **Conclusions:** The protein profile of MO HCC tissues was different from that of IM HCC tissues. The twenty differentially expressed proteins might play key roles in the carcinogenesis and progression of multinodular HCC. These newly identified proteins might be potential and valuable biomarkers for identifying the clonal origin of multinodular HCC.

Key words: liver neoplasm, intrahepatic metastasis, multicentric occurrence, multinodular hepatocellular carcinoma, proteomics, comparative proteomic analysis

【摘要】 背景与目的:多结节肝癌的起源既有单一原发肿瘤的肝内转移,又有各个结节单独存在的多中心性发生。我们对肝内转移组和多中心发生组多结节肝癌组织的全蛋白质表达谱进行比较分析,希望筛选出在多结节肝癌细胞克隆起源过程中发挥重要作用的差异蛋白分子。方法:应用双向凝胶电泳分离肝内转移组及多中心发生组多结节肝癌组织总蛋白,对两组间蛋白差异点应用质谱进行分析及数据库搜索、鉴定。结果:肝内转移组平均检测到(1025±52)个蛋白点($n=3$),多中心发生组平均检测到(900±98)个蛋白点($n=3$)。筛选出差异蛋白点 25 个,应用质谱鉴定出其中核纤层蛋白 A/C 异构体 2 等 20 种差异蛋白质。结论:多中心发生组与肝内转移组多结节肝癌的蛋白表达谱存在差异。鉴定出的 20 个差异表达蛋白可能参与肝癌的发生、发展、侵袭、转移,有可能成为潜在的、有应用价值的多结节肝癌细胞克隆起源鉴别分子标志。

关键词:肝肿瘤;肝内转移;多中心发生;多结节性;蛋白质组;比较蛋白质组学分析

中图分类号:R735.7 文献标识码:A

文章编号:1000-467X(2010)01-0052-07

肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 是全球常见的恶性肿瘤。在肝癌中, 多结节者占 12%~19%^[1]。多结节肝癌的起源既有单一原发肿瘤的肝内转移 (intrahepatic metastasis, IM), 又有各个结节单独存在的多中心性发生 (multicentric occurrence, MO)^[2]。运用比较蛋白质组学 (comparative proteomics) 研究策略研究蛋白质的差异表达谱, 通过比较不同病理生理条件下组织/细胞表达的全部蛋白质或亚细胞蛋白质中的差异蛋白质分子, 可能筛选出有临床应用价值的分子标记物和治疗靶标, 对肿瘤的诊断、治疗和预防具有深远的影响。本研究应用双向凝胶电泳 (2-DE) 结合基质辅助的激光解吸离子化-飞行时间质谱 (MALDI-TOF-MS) 技术, 对 IM 组和 MO 组多结节肝癌组织的全蛋白质组表达谱进行分析, 以期发现在多结节肝癌细胞克隆起源过程中发挥重要作用的差异蛋白分子, 为筛选可鉴别肝癌细胞克隆起源的蛋白标志物及建立诊断模型奠定基础。

1 材料与方法

1.1 组织样本

10 例多结节肝癌组织标本均来自广西医科大学第一附属医院 2004~2007 年手术切除肿瘤组织, 均经术后病理学检查证实。所有患者术前均未行化疗, 收取组织标本前均已履行告知义务, 并签署知情同意书。

1.2 多结节肝癌细胞克隆起源分析

同一细胞克隆起源的癌结节间基因表达一致, 为单中心性起源; 不同细胞克隆起源的癌结节的基因表达不一致或不全一致, 为多中心性起源^[3,4]。本研究以 P53、AFP 蛋白免疫组化分析, p53 exon7、bcl-10 基因突变分析, 线粒体 DNA (mitochondrial DNA, mtDNA) D-Loop 区序列分析共 5 项指标联合判别多结节肝癌各癌结节细胞克隆起源的异同。如多结节肝癌中各癌结节 5 项指标相同者, 判定为细胞克隆起源相同, 即为 IM; 如多结节肝癌中各癌结节 5 项指标不相同或不完全相同者, 判定为细胞克隆起源不相同, 即为 MO。根据上述标准, 10 例中 5 例鉴别为 IM, 5 例鉴别为 MO。MO 组 5 例均为男性; 年龄 29~64 岁, 中位年龄 44 岁, 共 10 个结节。IM 组 5 例中男性 4 例, 女性 1 例; 年龄 30~62 岁, 中位年龄 41 岁, 共 12 个结节。

1.3 组织样品总蛋白抽提

分别取 MO 组各标本, 每例标本切取 0.1 g 组

织, 以生理盐水冲洗净; 混合称重后移入预冷研钵内, 边加液氮边研磨至组织成粉末状, 将粉末完全移入 2 mL EP 管。按每 50 mg (30~80 mg) 组织加入 400 μ L 裂解液抽提总蛋白。冰浴振荡 1 h, 12 000 \times g 4 $^{\circ}$ C 离心 60 min, 吸取上清, Bradford 法检测蛋白浓度, -80 $^{\circ}$ C 分装保存。同法处理 IM 组标本抽提出总蛋白。

1.4 双向凝胶电泳及图像分析

参照 Amersham BioSciences 2-DE 用户手册进行双向电泳, 蛋白质上样量为 400 μ g。第一向在 IPG phor 水平电泳仪上进行等电聚焦, 上样总体积为 250 μ L, 水化 12 h 后进入等电聚焦阶段; 电压升至 8 000 V, 累积电压达 53 kV \cdot h 时结束聚焦。聚焦后胶条先后在含二硫苏糖醇 (1%) 和碘乙酰胺 (2.5%) 的平衡液中平衡 15 min, 后移至 12.5% 的聚丙烯酰胺凝胶上进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶 (SDS-PAG) 电泳, 15 $^{\circ}$ C 持续至溴酚蓝到胶底, 用双胺银染法 (分析胶) 和考马斯亮蓝 (制备胶) 染色。扫描获取图像, 用 ImageMaster 2D Platinum 6.0 软件 (Amersham Biosciences 公司) 行斑点检测和匹配分析。筛选表达水平差异 ≥ 2 倍, 且在 $\geq 50\%$ 的胶中均存在的蛋白点进行质谱分析。

1.5 蛋白质鉴定及数据库搜索

从制备胶上挖取差异蛋白点, 脱色液脱色 2 次, 乙腈脱水 2 次, 加 12.5 ng/ μ L 胰蛋白酶溶液 37 $^{\circ}$ C 酶解过夜。加多肽提取液孵育 20 min 后吸取上清液并重复 1 次, 获得的多肽混合液在氮气中干燥。加 0.7 μ L 基质充分混匀点样于 MALDI 加样板上, 进入 ABI 4700 TOF/TOF 质谱仪进行肽指纹谱和串联质谱鉴定。质谱数据送入 NCBI 非冗余数据库, 通过 MASCOT 引擎检索。

2 结果

2.1 多结节肝癌组织蛋白质表达谱分析结果

分别取 IM 组及 MO 组内混合组织样本的总蛋白进行 3 次 2-DE, 以保证实验的重复性。共获得 IM 组、MO 组各 3 块 2-DE 胶图谱; 两组蛋白表达谱类似, 蛋白多集中分布于 pI 4~8 间的区域 (图 1)。用 Image Master 2D Platinum 6.0 软件将凝胶分成 2 个类别进行点的鉴定分析, IM 组平均检测到 (1025 \pm 52) 个蛋白点 ($n=3$), MO 组平均检测到 (900 \pm 98) 个蛋白点 ($n=3$)。选择其中 2-DE 效果好、点数多的胶作为参考胶, 进行两组间的匹配分析 [IM 组与 MO 组匹配点数 (680 \pm 42) 个, 组间匹配率

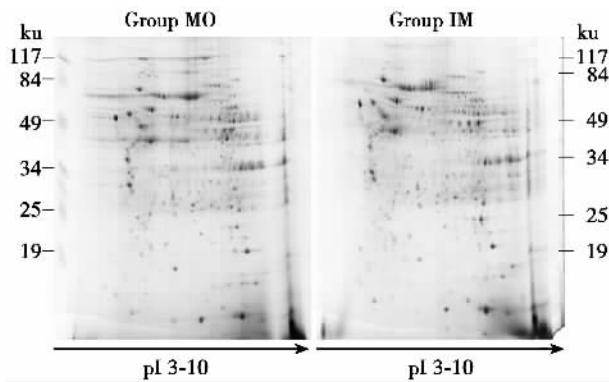


图 1 多中心发生多结节肝癌组织和肝内转移多结节肝癌组织蛋白 2-DE 银染图

Figure 1 2-DE gel of proteins detected by silver staining in Group MO and Group IM tissues

Group MO, multicentric occurrence of multinodular hepatocellular carcinoma; Group IM, intrahepatic of metastasis multinodular hepatocellular carcinoma.

为 65.6%], 筛选出差异 2 倍及 2 倍以上、覆盖率超过 50% 的蛋白点 25 个。

2.2 差异蛋白质点的质谱鉴定结果

从相应的考马斯亮蓝染色的制备胶中挖取差异较大的 25 个蛋白质点进行 MALDI-TOF-MS 质谱分析, 鉴定出核纤层蛋白 A/C 异构体 2 等 20 种蛋白质 (蛋白质评分 ≥ 60), 蛋白质鉴定结果见表 1、表 2。其中 10 种在单中心肝癌组织中表达上调 (图 2), 10 种在单中心肝癌组中表达下调 (图 3)。为保证取点的准确性, 每个点均从两块胶中挖取分别进行酶解鉴定, 得到的质谱结果一致。5823 号点的肽质量指纹图谱和串极指纹图谱见图 4。

3 讨论

IM 及 MO 肝癌在治疗方法和预后上存在着明

表 1 肝内转移组较多中心发生组上调的差异蛋白质点质谱鉴定结果

Table 1 Up-regulated expression proteins in Group IM compared with Group MO identified by MALDI-TOF-MS

No.	Protein	Database ID	Score	MW	PI	Coverage (%)
5580 ^a	Lamin A/C isoform 2	gil5031875	544	65095.6	6.4	67
5686	Protein disulfide isomerase	gil860986	334	56643.7	6.1	48
6114	78 kDa glucose-regulated protein precursor (GRP 78)	gil2506545	98	72377.5	5.07	11
6097	Carbonic anhydrase I	gil4502517	370	28852.4	6.59	44
5823	Vimentin	gil57471646	215	49623.1	5.19	38
5579 ^a	Lamin A/C isoform 2	gil5031875	445	65095.6	6.4	59
5792	Calreticulin precursor variant	gil62897681	88	46890.1	4.3	19
4489	^a Chain A, human serum albumin mutant R218p	gil31615331	64	66369.9	5.62	18
4394	Alpha enolase ^b	gil2661039	127	36285.6	6.53	47
4123	Chaperonin (HSP60) ^b	gil306890	292	60986.4	5.7	28
4015	Glutamate dehydrogenase 1 variant ^b	gil62897195	111	61301.2	8.05	3

^a5579/5580 spots are identified as a same protein. ^bSpecific spots in intrahepatic metastasis group.

Group MO, multicentric occurrence multinodular hepatocellular carcinoma; Group IM, intrahepatic metastasis multinodular hepatocellular carcinoma.

表 2 肝内转移组较多中心发生组下调的差异蛋白质点质谱鉴定结果

Table 2 Down-regulated expression proteins in Group IM compared with Group MO identified by MALDI-TOF-MS

No.	Protein	Database ID	Score	MW	PI	Coverage (%)
5998	Glyoxylate reductase/hydroxypyruvate reductase	gil6912396	103	35645.7	7.01	38
5981	Aging-associated gene 9 protein	gil54303910	97	36026.4	8.57	22
6088	Ketohexokinase	gil558216	491	25212.8	5.99	61
6339	Chain A, X-ray crystal structure of human galectin-1	gil42542977	60	14583.2	5.34	26
5564 ^a	Phosphoenolpyruvate carboxykinase 2	gil12655193	534	70653.6	7.57	43
5563 ^a	Phosphoenolpyruvate carboxykinase 2	gil12655193	270	70653.6	7.57	27
6017	Tropomyosin	gil339956	250	30362.4	4.64	39
5420	Aconitase 1	gil8659555	390	98336.6	6.23	29
5915	Chain A, crystal structure of mutant macrophage capping protein (Cap G)	gil33357110	177	38557.5	5.42	16
6134	Mitochondrial short-chain enoyl-coenzyme A hydratase 1 precursor ^b	gil12707570	138	31351.1	8.34	15
5704	Keratin type II ^b	gil908805	84	60030.3	8.09	19

^a5563/5564 spots are identified as a same protein. ^bSpecific spots in multicentric occurrence group.

Abbreviations as in Table 1.

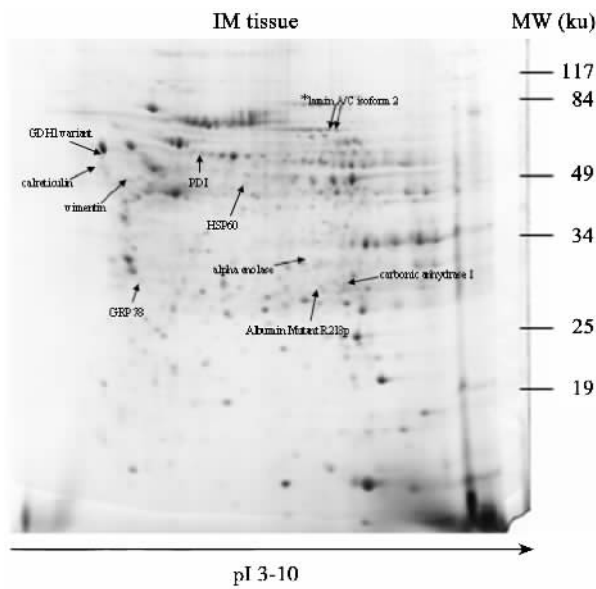


图 2 肝内转移组比多中心发生组上调的蛋白质点

Figure 2 Up-regulated expression proteins in Group IM identified by MALDI-TOF-MS

2-DE gel of proteins detected by silver staining in intrahepatic metastasis group (Group IM) is presented; *5579/5580 spots are identified as a same protein.

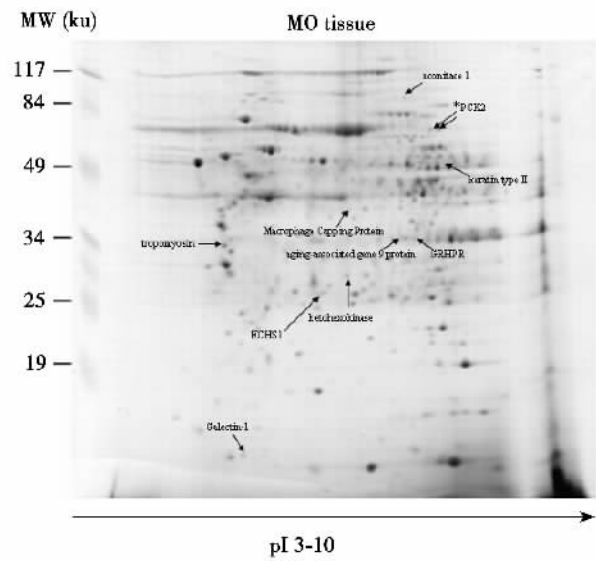


图 3 肝内转移组比多中心发生组下调的蛋白质点

Figure 3 Down-regulated expression proteins in Group IM identified by MALDI-TOF-MS

2-DE gel of proteins detected by silver staining in multicentric occurrence group (Group MO) is presented; *5563/5564 spots are identified as a same protein.

显不同^[5,6]。临床上对此加以区分对治疗前的评估、治疗方法的选择和治疗后生存的预测有重要意义。目前采用分子生物学技术鉴别 IM 与 MO 尚存在一定的局限。如 P53 突变在肝癌中表达率较低^[7]。mtDNA D-Loop 区的突变可能发生在肝癌发展过程中的任何阶段,对所有癌结节进行检测均未发现突变的病例,确定各个结节细胞克隆来源较困难。本研究应用双向凝胶电泳结合质谱技术分析多结节肝癌中 IM 组与 MO 组的蛋白质表达谱,结果显示两组间存在热休克蛋白 60 (HSP60)、波形蛋白(vimentin)等差异蛋白,从蛋白质组学方面为鉴别多结节肝癌的 IM 与 MO 提供了新的线索,为寻找更灵敏的蛋白质标志物奠定了一定的实验基础。但由于 2-DE 等实验过程中仍然存在样本例数局限、样本处理、染色等一些不稳定因素,可干扰实验的重复性;对初步筛选出来的 IM 组与 MO 组多结节肝癌的差异性蛋白质,仍需进行相应的验证及进一步研究。

我们应用 2-DE 结合 MALDI-TOF-MS 技术从 IM 组与 MO 组间鉴定出 20 种差异表达蛋白。这些初步鉴定的差异蛋白质中有近一半是参与物质代谢和生物转化相关的酶,其他还包括有与细胞生物信号转导、细胞运动调控、免疫调节、凋亡调控等相

关的蛋白质。上述的差异表达蛋白中,部分差异蛋白如乙醛酸还原酶/羟基丙酮酸还原酶、衰老相关基因 9 蛋白、人血清白蛋白突变体 R218p 等在肝癌中的表达变化在类似研究中为新报道,其在肝癌发生、侵袭、转移中的作用需进一步研究、验证。

在鉴定出的 20 种蛋白中,9 种蛋白参与了物质代谢和生物转化,但这些酶或蛋白与肿瘤发生发展直接相关的较少。提示这些蛋白在癌变过程中的表达变化可能是伴随性改变,以适应肿瘤细胞失控性生长的高代谢需要。Takashima 等^[8]发现烯醇化酶 α 在丙肝病毒(HCV)相关性 HCC 组织中比在相应的非肿瘤肝组织中表达明显增强,且其表达随肿瘤的去分化增高,在分化差的 HCC 中其水平明显高于分化好的 HCC;免疫印迹分析和免疫组化证实该蛋白的表达与肿瘤大小和静脉侵袭成正相关。另 Li 等^[9]的研究发现,烯醇化酶 α 在肝癌组织中比在癌旁组织表达上调近 3 倍。在本研究中烯醇化酶 α 为 IM 组中的特异性表达点,考虑与肿瘤侵袭、转移阶段细胞生长迅速,有氧化还原减弱,更依赖糖酵解供能有关。有研究发现在肝癌中烯酰辅酶 A 水合酶(ECHS)的表达降低^[10]。另有研究表明,任何降低线粒体氧化磷酸化功能的事件均可促进氧化组织中发生转化的细胞或肿瘤细胞的增殖,呼吸

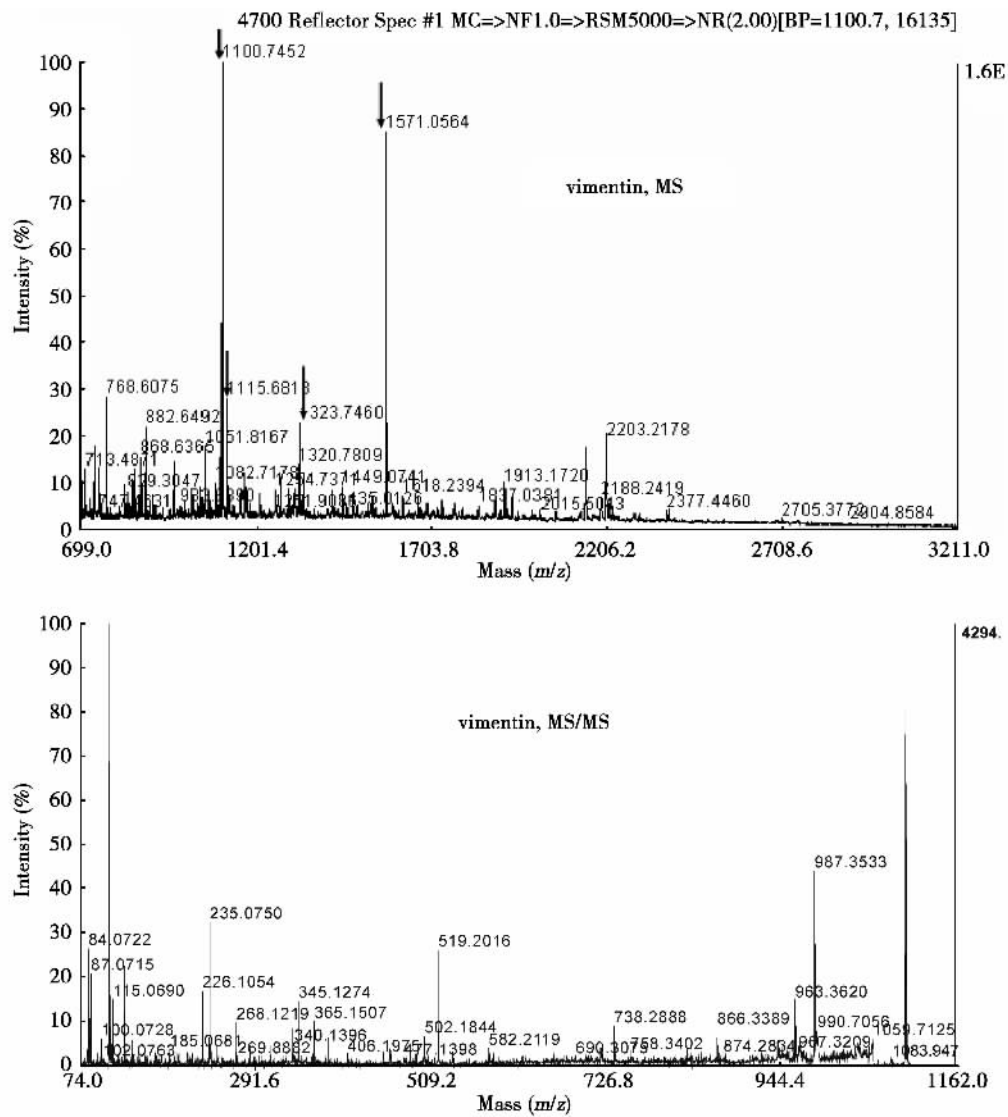


图4 5823号点的肽质量指纹图谱(A)和肽段1100.74的串联指纹图谱(B)

Figure 4 MALDI-TOF-MS results for spot 5823 (vimentin)

A, peptide MS map for spot 5823; B, tandem MS map for peptide 1100.74.

酶复合体大量减少与肿瘤细胞快速增长和侵袭性增加密切相关^[11]。本研究中线粒体 ECHS 1 前体在 MO 组中表达,而在 IM 组中未见表达,支持上述观点。

HSP70 和 HSP60 为热休克蛋白的两个重要家族,具有高度的物种保守性。HSP60 在体内的功能主要包括应激、免疫调节、抗凋亡、信号转导等。有文献报道 HSP60 与表达于乳腺癌细胞膜的 $\alpha_3\beta_1$ 整合素结合,可提高后者活性,而肿瘤细胞的增殖和肿瘤的转移、侵袭都依赖于 $\alpha_3\beta_1$ 整合素的活性,认为 HSP60 在乳腺癌细胞的转移中发挥了重要作用^[12]。Kuramitsu 等^[13]研究发现,HSP60 在 HCV 相关性 HCC 组织中表达上调。在本研究中 chaperonin

(HSP60)在 IM 组中较 MO 组中表达上调,支持以上观点。葡萄糖调节蛋白 78 (glucose regulated protein, GRP78), 又名免疫球蛋白重链结合蛋白 (the immunoglobulin heavy chain binding protein, Bip), 与 HSP70 家族具有高度同源性,被认为是 HSP70 家族的成员之一。Luk 等^[14]报道 GRP78 在肝癌组织中表达上调,且与肿瘤静脉侵袭有关;并认为肿瘤细胞增强伴侣蛋白的表达与细胞保护功能和促进肿瘤增生、转移有关。Lim 等^[15]研究发现 GRP78 的表达随着乙肝病毒 (HBV) 相关性 HCC 形成阶段进展而逐渐上调,且 GRP78 的表达与肿瘤血管侵袭和肝内转移相关。苏荣健等^[16]研究发现,特异性下调 GRP78 在体外可以抑制 HCC 的侵袭和

转移。在本研究中 78 ku glucose-regulated protein precursor (GRP 78)在 IM 组中较 MO 组中表达上调,支持上述观点。蛋白质二硫键异构酶(protein disulfide isomerase, PDI)为应激相关蛋白,又是内质网分子伴侣家族重要成员;作为酶 PDI 可催化蛋白质分子中二硫键的形成,作为分子伴侣 PDI 在蛋白质的翻译及翻译后进行的转运过程中起着重要作用。Teramoto 等^[17]研究发现,蛋白质二硫键异构酶结合蛋白 3 (protein disulfide isomerase-associated 3, PDIA3)的表达与肝癌及 AFP 水平相关。在本研究中蛋白质二硫键异构酶在 IM 组中表达较在 MO 组中上调,提示其在肝癌的不同阶段表达水平有差异。

波形蛋白(vimentin)为中间丝蛋白之一,主要表达于间充质来源的细胞及某些未分化细胞,但也可能“反常”地表达于一些上皮源细胞,尤其是上皮源肿瘤细胞^[18]。Hu 等^[19]应用 cDNA 微阵列和免疫组化法发现,在肝癌细胞和肝癌组织中波形纤维蛋白呈过表达,且波形纤维蛋白与肝癌细胞转移具有密切的关系。叶丽虹等^[20]研究发现,在高转移倾向的肝癌细胞中波形纤维蛋白表达上调。在本研究中波形蛋白在 IM 组中较 MO 组中表达上调,支持上述观点。原肌球蛋白(tropomyosin, TM)是一种细胞骨架蛋白,与细胞移动、形态发生和调节肌动蛋白丝等过程有关。叶丽虹等^[20]报道在高转移倾向的肝癌细胞 M2H7402 中原肌球蛋白的表达量高于亲本细胞。亦有研究显示,在 HCV 相关性 HCC 中原肌球蛋白 β 链表达下调^[13]。有研究显示 TM2 在早期膀胱癌组织中的表达高于晚期膀胱癌^[21]。Sibley 等^[22]研究认为,在高比例的浅表性移行细胞癌(TCC)中存在着激活的成纤维细胞生长因子受体 3(FGFR-3)突变,这种受体是经丝裂原活化蛋白激酶信号途径(MEK-ERK)介导的,因此在这些肿瘤中 TM 表达水平下调是可能的。上述研究结果提示, TM 与肿瘤生成和转移相关,且作用的差异可能与细胞特异性有关。在本研究中,原肌球蛋白在 IM 组中较 MO 组中表达下调,其机制有待进一步研究。

综上所述,我们认为应用比较蛋白质组学策略从复杂的肝癌组织标本中筛查多结节肝癌不同细胞克隆起源的差异蛋白表达谱,可较理想地显示多因素影响下的肿瘤细胞全蛋白质组的改变,为寻找直接参与肿瘤发生、发展、侵袭、转移的关键蛋白质分子拓展了思路,为更准确的分子分型

提供了实验依据,有助于阐明多结节肝癌不同细胞克隆起源的病理生理机制,为临床提供可以用于早期诊断、判断疗效、评估预后和治疗靶标等的分子标记。

[参 考 文 献]

- [1] Okuda K, Peters PL, Simson IW. Gross anatomic features of hepatocellular carcinoma from three disparate geographic areas: proposal of new classification [J]. *Cancer*, 1984,54(10):2165-2173.
- [2] Yamamoto T, Kajino K, Kudo M, et al. Determination of the clonal origin of multiple human hepatocellular carcinomas by cloning and polymerase chain reaction of the integrated of hepatitis B virus DNA [J]. *Hepatology*, 1999,29(5):1446-1452.
- [3] Nowell PC. The clonal evolution of tumor cell populations [J]. *Science*, 1976,194(4260):23-28.
- [4] Calabrese P, Tavaré S, Shibata D. Pretumor progression: clonal evolution of human stem cell populations [J]. *Am J Pathol*, 2004,164(4):1337-1346.
- [5] Yasui M, Harada A, Nonami T, et al. Potentially multicentric hepatocellular carcinoma: clinicopathologic characteristics and postoperative prognosis [J]. *World J Surg*, 1997,21(8):860-865.
- [6] 黎乐群,彭 涛,林进令,等. 复发性肝细胞癌的细胞克隆来源及其与复发时间的关系 [J]. *中华肝胆外科杂志*, 1999,5(1):11-13.
- [7] Pontisso P, Belluco C, Bertorelle R, et al. Hepatitis C virus infection associated with human hepatocellular carcinoma: lack of correlation with p53 abnormalities in Caucasian patients [J]. *Cancer*, 1998,83(8):1489-1494.
- [8] Takashima M, Kuramitsu Y, Yokoyama Y, et al. Overexpression of alpha enolase in hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma; association with tumor progression as determined by proteomic analysis [J]. *Proteomics*, 2005,5(6):1686-1692.
- [9] Li C, Tan YX, Zhou H, et al. Proteomic analysis of hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma: Identification of potential tumor markers [J]. *Proteomics*, 2005,5(4):1125-1139.
- [10] Yokoyama Y, Kuramitsu Y, Takashima M, et al. Proteomic profiling of proteins decreased in hepatocellular carcinoma from patients infected with hepatitis C virus [J]. *Proteomics* 2004, 4(7): 2111-2116.
- [11] Simonnet H, Alazard N, Pfeiffer K, et al. Low mitochondrial respiratory chain content correlated with tumor aggressiveness in renal cell carcinoma [J]. *Carcinogenesis*, 2002,23(5): 759-768.
- [12] Barazi HO, Zhou L, Templeton NS, et al. Identification of heat shock protein 60 as a molecular mediator of alpha 3 beta 1 integrin activation [J]. *Cancer Res*, 2002,62(5):1541-1548.

- [13] Kuramitsu Y, Nakamura K. Current progress in proteomic study of hepatitis C virus-related human hepatocellular carcinoma [J]. *Expert Rev Proteomics*, 2005,2(4):589-601.
- [14] Luk JM, Lam CT, Siu AF, et al. Proteomic profiling of hepatocellular carcinoma in Chinese cohort reveals heat-shock proteins (Hsp27, Hsp70, GRP78) up-regulation and their associated prognostic values [J]. *Proteomics*, 2006,6(3):1049-1057.
- [15] Lim SO, Park SG, Yoo JH, et al. Expression of heat shock proteins (HSP27, HSP60, HSP70, HSP90, GRP78, GRP94) in hepatitis B virus-related hepatocellular carcinomas and dysplastic nodules [J]. *World J Gastroenterol*, 2005,11(14):2072-2079.
- [16] 苏荣健,李 贞,程留芳,等. 特异性下调葡萄糖调节蛋白 78 表达对肝细胞癌侵袭和转移能力的影响 [J]. *细胞生物学杂志*, 2007,29(6):889-894.
- [17] Teramoto R, Minagawa H, Honda M, et al. Protein expression profile characteristic to hepatocellular carcinoma revealed by 2D-DIGE with supervised learning [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2008,1784(5):764-772.
- [18] Fraga CH, True LD, Kirk D. Enhanced expression of the mesenchymal marker, vimentin, in hyperplastic versus normal human prostatic epithelium [J]. *J Urol*, 1998,159(1):270-274.
- [19] Hu L, Lau SH, Tzang CH, et al. Association of Vimentin overexpression and hepatocellular carcinoma metastasis [J]. *Oncogene*, 2004,23(1):298-302.
- [20] 叶丽虹,秦宵然,张晓东,等. 原肌球蛋白、波形纤维蛋白和热休克蛋白 70 在肝癌转移亚细胞中表达上调 [J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2005,21(2):244-249.
- [21] Pawlak G, McGarvey TW, Ngyen TB. Alterations in tropomyosin isoform expression in human transitional cell carcinoma of the urinary bladder [J]. *Int J Cancer*, 2004,110(3):368-373.
- [22] Sibley K, Cuthbert-Heavens D, Knowles MA. Loss of heterozygosity at 4p16.3 and mutation of FGFR-3 in transitional cell carcinoma [J]. *Oncogene*, 2001,20(6):686-691.

[编辑及校对:张 菊]